



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Pestalotiopsis theae* ASSOCIADO À PALMA DE ÓLEO

Alessandra de Jesus Boari¹, Célia Regina Tremacoldi², Clenilda Tolentino Bento da Silva³, Manoel Luiz Andrade da Silva⁴; Taise Pereira Carvalho⁵, Rozangela Souza da Silva⁶

¹ Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, ajboari@cpatu.embrapa.br

² Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, tremacol@cpatu.embrapa.br

³ Assistente Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, clenilda@hotmail.com

⁴ Assistente Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, monoel@hotmail.com

⁵ Bolsista ITI Universidade Federal Rural da Amazônia, taisecarvalho_proswin@hotmail.com

⁶ Bolsista ITI Universidade Federal Rural da Amazônia, rozsilva@hotmail.com

Resumo: A palma de óleo é umas das principais culturas do Estado do Pará, e que se encontra em franca expansão. Muitos fungos saprofíticos, fitopatogênicos e endofíticos podem ser encontrados nesta cultura. Durante a investigação de fitopatógenos nesta cultura verificou-se a presença de alguns fungos provenientes de palmas de óleo. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de identificar uma dessas espécies de fungo por meio do PCR, seguido do sequenciamento nucleotídico. Para isso, tecidos de folhas de palma de óleo que apresentavam necrose e de estipe foram plaqueados em meio ágar-água. Posteriormente, os fungos foram repicados para meio BDA e mantidos a temperatura ambiente. Após 10 dias, dois isolados fúngicos tiveram seu DNA extraído para realização do PCR utilizando os *primers* ITS4 e ITS5. Os produtos do PCR foram sequenciados e avaliados via programas Blast e ClustalW, onde se verificou identidade de 99 a 100% com vários acessos de *Pestalotiopsis theae*. Os isolados foram mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para futuros estudos de patogenicidade e dos seus compostos bioativos. Este foi o primeiro relato de *P. theae* em palma de óleo no Brasil.

Palavras-chave: prospecção, fungo, *Elaeis guineensis* Jacq.

Introdução

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (TRINDADE et al., 2005).

Vários fungos associados à palma de óleo foram relatados. Dentre ele os do gênero *Pestalotiopsis*. As espécies de *Pestalotiopsis* são muito comuns, ocorrendo em uma vasta gama de



substratos, e muitos são saprófitas, enquanto outras são ou patogênicas ou endofíticas em folhas e ramos de plantas. Fungos endofíticos são bem conhecidos como fontes de bioativo metabólitos secundários. Investigações químicas de alguns isolados de *Pestalotiopsis* spp. proporcionaram uma variedade de bioativos naturais (FIGUEIREDO, 2006).

Durante a investigação de fitopatógenos associados à palma de óleo verificou-se a presença de fungos do gênero *Pestalotiopsis*. Assim, objetivou-se identificar e caracterizar molecularmente estes via teste de PCR utilizando *primers* da região ITS, seguido de sequenciamento de DNA.

Material e Métodos

Amostras de estipe e folhas necrosadas de palma de óleo, provenientes de plantios dos municípios de Moju-PA e Bonito-PA, foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental onde se procedeu ao isolamento fúngico.

Tecidos do interior do estipe e de folhas foram externamente esterilizados com álcool 70% e hipoclorito, plaqueados em ágar-água e, posteriormente, repicados para meio BDA. As placas foram mantidas em temperatura ambiente até o aparecimento da frutificação do fungo. Em seguida, o fungo foi analisado em microscopia óptica para sua identificação.

Posteriormente, foi feita a extração do DNA dos isolados fúngicos. Para isso, a colônia fúngica foi raspada da placa e, em seguida, realizou-se a extração utilizando o protocolo de Gibbs e Makenzie (1997). Para a realização do PCR utilizou-se 1µL do DNA fúngico, 10µL de tampão 5X, 5µL de MgCl₂, 0,5µL dos primers ITS4 e ITS5, 1µL de dNTP, 0,3µL de Taq polimerase e 31,7µL de água ultra pura. Foi feito 30 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s e 72°C/30s, seguido de 72°C por 5 minutos. O produto do PCR foi avaliado em gel de agarose 0,7%, corado com GelRed (Biotium) e fotodocumentado. Posteriormente, fez-se a limpeza do produto do PCR utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguido da quantificação de DNA. Os produtos de PCR da região ITS foram sequenciados pela empresa Helixxa base for Life. As sequencias foram avaliadas utilizando os programas Blastn (ALTSCHUL et al., 1997) e ClustalW (THOMPSON et al., 1994)

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA com cerca de 530pb, a partir dos dois isolados fúngicos da palma de óleo. Os dois isolados, um de estipe e outro associados à mancha foliar da palma de óleo cultivar Compacta, apresentaram identidade de 99 a 100% com acessos de *Pestalotiopsis theae* disponíveis no GenBank. Entre os dois isolados da palma de óleo observou-se 99,6% de identidade.



Figura 1: Conídios de *Pestalotiopsis theae* isolado estipe da palma de óleo. Foto: Boari, A.J.

Pestalotiopsis theae pertence ao filo Ascomycota, Ordem Xylariales e família Amphisphaeriaceae.

O fungo *P. theae* foi relatado como fitopatógeno causando mancha foliar em plantas de chá (*Camellia sinensis*), mas também como endofítica. A toxina indutora de necrose das folhas de chá foi identificada como *Pesthetoxin* (KIMURA et al., 1998). Na Espanha foi relatada como causadora de mancha foliar e posterior desfolhação de caqui doce (TUSET et al., 1999).

Associações endofíticas têm sido descritas para *Pestalotiopsis*, sendo estas, comumente encontradas em regiões subtropicais e tropicais (WEI et al., 2007). Existem relatos da produção de metabólitos secundários com aplicabilidades medicinais e biotecnológicas como: o taxol que combate o câncer (LI et al., 2005); um polissacarídeo com ação anti-diabética (KIHO et al., 1997); pestalotheols AD (1-4) que inibe a replicação de HIV (LI et al., 2008); ácido ambuico, agente antifúngico (FIGUEIREDO, 2006); a isopestacina, com propriedades antifúngicas e antioxidantes (JEEWON et al., 2002).

Os isolados de *P. theae* obtidos em plantios de palma de óleo foram depositados na coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para futuros testes de patogenicidade e dos seus potenciais usos na medicina ou controle biológico de fitopatógenos.



Conclusão

Os isolados fúngicos provenientes de folha necrosada e estipe de palma de óleo são de *Pestalotiopsis theae*.

Agradecimentos

Ao FINEP, CNPq e a Agroindústria Marborges SA.

Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; BARRET, A.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, Cambridge, v.25, p.3389-3402, 1997.
- FIGUEIREDO, J. A. G. **Bioprospeção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of virology methods**, v. 63, p. 9-16, 1997.
- JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera Inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, p. 378-392, 2002.
- KIMURA, Y.; KOUGE, A.; NAKAMURA, K.; KOSHINO, H. Pesthetoxin, a new phytotoxin produced by the gray blight fungus, *Pestalotiopsis theae*. **Biosciences Biotechnology Biochemistry**. v. 62, n.8, p. 1624-1626, 1998.
- LI, E.; TIAN, R.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Pestalotheols A-D, Bioactive Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis theae*. **J. Nat. Prod.** v.71, n.4, p. 664-8, 2008.
- LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515–1519, 2005.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673-4680, 1994.
- WEI, J.G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. **Fungal Diversity** v. 15, p. 247-254, 2004.